

БИОНИЧЕСКИЕ¹ КОРАЛЛЫ, ИЗГОТОВЛЕННЫЕ ПО ТЕХНОЛОГИИ ТРЕХМЕРНОЙ ПЕЧАТИ²

Daniel Wangprasert^{3,4,5}, Shangting You⁶, Fariq Azam⁵, Gianni Jacucci⁴, Olga Gaidarenko⁵, Mark Hildebrand^{6,7}, Michael Kühf^{6,8}, Alison G. Smith⁹, Matthew P. Davey¹⁰, Alyssa Smith⁴, Dimitri D. Debeyn⁵, Shaochen Chen⁷, Silvia Vignolini⁴

Nature Communications¹⁰

Article <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15486-4>

Bionic 3D printed corals

9 апреля 2020 г.

Кораллы эволюционировали как оптимизированные системы с ускоренным фотосинтезом под действием квантов электромагнитного излучения (фотонов), что приводит к росту микроводорослей с эффективным использованием пространства и с наивысшей квантовой эффективностью¹¹ фотосинтеза. Ослабление света из-за затенения водорослей является ключевым ограничивающим фактором для увеличения масштабов культивирования микроорганизмов. Системы управления освещением, заимствованные у кораллов, могут помочь в преодолении этих ограничений и содействовать масштабируемому производству биоэнергии и биопродукции. Авторы статьи разработали бионические кораллы, изготовленные по технологии трехмерной печати, которые способны выращивать микроводоросли¹² с высокой пространственной плотностью кле-

¹ Бионика – прикладная наука о применении в технических устройствах и системах принципов организации, свойств, функций и структур живой природы, т.е. формам живого в природе и их промышленных аналогах.

² 3D печать, или аддитивное производство – процесс создания цельных трехмерных объектов практически любой формы на основе цифровой модели. Она основана на концепции построения объекта последовательно наносимыми слоями, отображающими контуры модели.

³ Группа биотехнологической фотоники, Химический факультет, Кембриджский университет, Кембридж, Великобритания.

⁴ Институт океанологии Скриппса, университет в Калифорнии Сан-Диего, США.

⁵ Секция морской биологии, Биологический факультет, университет Копенгагена, Дания.

⁶ Факультет нанотехники, университет в Калифорнии Сан-Диего, США.

⁷ Покойный.

⁸ Независимая группа по вопросам изменения климата, Технологический университет Сиднея, Австралия.

⁹ Факультет растениеводства, Кембриджский университет, Великобритания.

¹⁰ Рецензируемый научный журнал с открытым доступом, который издается международной издательской компанией Nature Research с 2010 г. Это мультидисциплинарный журнал, охватывающий естественные науки, включая физику, химию, науки о Земле, медицину и биологию.

¹¹ Квантовая эффективность – характеризующая фоточувствительные приборы и материалы, равная отношению количества фотонов, поглощенные образцом вызывает образование квазичастиц, к общему количеству поглощенных фотонов.

¹² Микроводоросли внутри кораллов придают им цвет и обеспечивают пищу путем фотосинтеза.

ток до 10^9 клеток/мл. Производятся гибридные фотосинтетические¹³ биологические материалы¹⁴ с 3D печатной платформой¹⁵, которая имитирует морфологические особенности живой ткани коралла и лежащего ниже остова (скелета), с микронным разрешением, включая их оптические и механические свойства. Программируемая синтетическая микромасштабная среда, таким образом, дает возможность копировать как структурные, так и функциональные признаки симбиоза коралла и водорослей. В работе определен класс бионических материалов, которые могут взаимодействовать с живыми организмами, и которые можно использовать для прикладных исследований коралловых рифов и конструирования фотобиореактора¹⁶.

Благодаря высокой эффективности фотосинтеза симбиоза кораллов и водорослей, коралловые рифы входят в число самых продуктивных экосистем в мире [1]. Фотосинтетические характеристики кораллов были оптимизированы в ходе эволюции в конкурентной среде обитания с ограниченными ресурсами, что привело к управлению светом с высокой эффективностью использования пространства, высокой плотностью клеток водорослей и квантовой эффективности фотосинтеза, которые приближаются к теоретическим пределам [2, 3]. В то время как развивалось множество геометрий для достижения таких характеристик, все они характеризуются живой тканью, содержащей микроводоросли, построенной на скелете из карбоната кальция, который служит как механическая опора и рассеивающая среда для оптимизации доставки света к тканям, в которых находятся водоросли, которые в противном случае были бы затенены [4, 5]. Такие само затемняющие водоросли в настоящее время являются основным ограничивающим фактором для увеличения масштабов культивирования микроводорослей [6, 7]. Поэтому изготовление бионических кораллов, когда искусственные биологические материалы, служащие пристанищем для микроводорослей, может быть важнейшим для кардинального изменения стратегий управления светом для производства биоэнергии и биопродукции [8, 9].

Мотивируемые оптимальным управлением света в кораллах, авторы разработали платформу биопечати, способную использовать технологию трехмерной печати живого биосинтетического вещества, имитирующего коралловую ткань и исходную геометрию скелета. Живые гибридные бионические кораллы способны культивировать клетки водорослей с высокой плотностью до 10^9 клеток/мл. Такие данные позволяют проложить путь к созданию биоматериалов, навешенных кораллами, которые могут найти использование в биотехнологии водорослей, сохранении коралловых рифов и в исследовании симбиоза кораллов и водорослей.

¹³ Фотосинтез – сложный химический процесс преобразования энергии видимого света в энергию химических связей органических веществ при участии фотосинтетических пигментов (хлорофилл у растений, бактериохлорофилл у бактерий и бактериодопсин у архей – одноклеточных микроорганизмов).

¹⁴ Биологические материалы создавались природой специально, целенаправленно для живых организмов, для их эффективной жизнедеятельности всего из двух видов полимеров (белки и углеводы) за счет биосинтеза (белки из 20 аминокислот) и фотосинтеза полисахаридов (из малого набора химических элементов, содержащихся в атмосфере, водоемах, почве и солнечной энергии).

¹⁵ Биопечать происходит с использованием специально разработанных 3D-биопринтеров послойно по цифровой трехмерной модели. Картриджи принтеров при этом заправляют сфероидами – конгломератами клеток, которые наносят на специальную подложку, своеобразную биобумагу. Биобумага или гидрогель создается из белков, полисахаридов и других органических компонентов, которые создают вокруг переносимых клеток необходимую среду.

¹⁶ Фотобиореактор – аппараты для осуществления управляемого культивирования фотосинтезирующих микроводорослей.

Результаты и обсуждение

Разработка бионических кораллов, изготовленных по технологии трехмерной печати

Предложенная авторами платформа биопечати способна с использованием 3D-печати изготавливать оптически регулируемый фотосинтетический материал, который имитирует коралловую ткань и морфологию скелета с точностью микронного масштаба (рис. 1 a-g). В принципе, предложенный способ позволяет дублировать любую архитектуру коралла (дополнение к рис. 1), предлагая различные проектные решения для увеличения распространения света. Быстро растущие кораллы семейства *Pocilloporiidae*¹⁷ являются особенно важными для исследования процесса управления светом. Несмотря на высокую плотность клеток водорослей в их тканях (1×10^6 клеток на 1 см^2 площади поверхности), распределение внутренней плотности потока однородное, предотвращается самозатенение симбиотических микроводорослей [10]. Распределение фотонов управляется главным образом скелетом арагонита¹⁸, когда свет просачивается из скелета в ткань коралла, доставляя фотоны глубоко внутрь кораллита¹⁹ [4, 10]. Кроме того, свет может легче проникать в коралловую ткань, чем выходить, так как поднимающийся под низким углом свет улавливается под действием внутреннего отражения из-за несоответствия показателя преломления между тканью кристалла и окружающей морской водой [11]. Авторы имитировали эти стратегии управления светом и разработали бионический коралл, созданный из устойчивых полимеров, для увеличения поглощения света и роста микроводорослей.

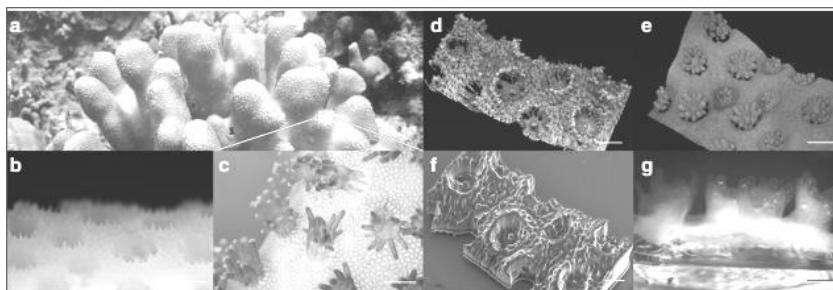


Рис. 1 Структура натуральных и напечатанных на 3D-принтере бионических кораллов.

¹⁷ Поциллопоры – кишечнополостные, модрепоровые коралловые полипы (отряд коралловых полипов из подкласса шестилучевых кораллов), распространенные у берегов Австралии, Маршалловых и Гавайских островов.

¹⁸ Драгонит – минерал, один из естественных полиморфов карбоната кальция, образующий призматические, столбчатые, игольчатые и копьевидные кристаллы.

¹⁹ Кораллит – чашечка одиночного кораллового полипа.

Колония кораллов *Stylophora pistillata*²⁰, растущих на глубине около 10 м на рифе Ватакоби, Восточный Сулавеси, Индонезия (а). Фотография крупным планом (б, в) и сканирование оптической когерентной томографии (д, е) кораллового скелета и коралловой ткани соответственно. Полученное с помощью сканирующей электронной микроскопии изображение успешной копии скелета, напечатанной на 3D-принтере, демонстрирующее кораллиты в масштабе 1: 1 относительно оригинального дизайна. (ф) Фотография роста живых бионических кораллов с выращиванием микроводорослей *Symbiodinium sp.*²¹ (г) Живая ткань была напечатана поверх имитатора скелета, и бионический коралл культивировали в течение 7 дней. Масштабная линейка = 1 мм (б – в) и 750 мкм (г).

Для точного контроля разрозненных свойств биотехнологических искусственных ткани и скелета авторы разработали двухстадийный подход на основе прогнозируемого непрерывного света для многослойной 3D-био-печати. Оптимизация подхода к печати требует тонкого баланса между несколькими параметрами, включая пригодность для печати (разрешение и механическая поддержка), выживаемость клеток и оптические характеристики. Конструкции из искусственной ткани кораллов изготавливаются с использованием нового раствора биочернил²², в котором симбиотические микроводоросли (*Symbiodinium sp.*) смешивали с фотополимеризуемым²³ желатин-метакрилатным гидрогелем и нано кристаллами, полученными из целлюлозы (CNC); последние обеспечивают механическую стабильность и позволяют упорядочить свойства рассеивания ткани [12,13]. Точно так же искусственный скелет напечатан на 3D-принтере из полимера на основе диакрилата полиэтиленгликоля (PEGDA) [14], легированного CNC.

Если основываться на оптимизации с помощью экспериментов и оптического моделирования (рис. 2а – в), то функциональная единица искусственного скелета представляет собой структуру абиотической чаши, имеющую форму неорганического кораллита (см. сноску 19) карбоната кальция (1 мм в диаметре и глубине) и настроенную для перераспределения фотона через широкополосное диффузное рассеяние света (длина свободного пробега = 3 мм между 450 и 650 нм) и близкое к изотропному угловое распределение рассеянного света (рис. 2г, дополнительный рис. 2), аналогичные оптическим свойствам каркаса быстрорастущего неповрежденного коралла [5,10]. Инспирированная кораллами ткань имеет цилиндрические конструкции (шириной 200 мкм и длиной 1 мм), радиально расположенные по периферии кораллитов, имитирующие щупальца кораллов, которые служат для увеличения площади поверхности, подверженной воздействию

²⁰ Коралловый кашпошон или гладкий коралл цветной капусты, разновидность каменистых кораллов в системе Pocilloporidae.

²¹ Вид симбиотической желтой водоросли (зооксантелла) из класса динофлагелляты. Они играют важнейшую роль в благополучии коралловых рифов.

²² Биочернила – материалы, используемые для производства инженерных/искусственных тканей с использованием 3D-печати. Эти чернила состоят в основном из используемых клеток, но часто применяются в сочетании с дополнительными материалами, которые покрывают клетки.

²³ Фотополимеризация – образование полимеров под действием света, главным образом, ультрафиолетового излучения. Осуществляется в газовой, жидкой и твердой фазе.

света [15] (рис. 2а). Авторы сконструировали ткань бионического коралла с конусом прямого рассеяния (рис. 2h), который позволяет свету достигать рассеянного назад скелета (рис. 2а).

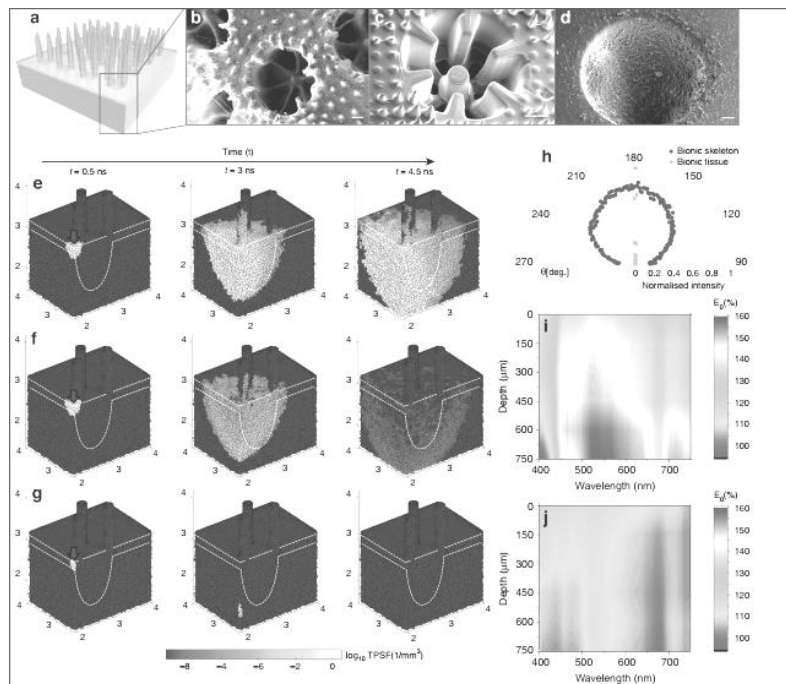


Рис. 2 Оптические свойства ткани и скелета бионического коралла, напечатанных на 3D-принтере.

3D-рендеринг²⁴ окончательного дизайна бионического коралла (а). Оптимизация дизайна бионического скелета (b – d), показывающая SEM-изображения (сканирующая электронная микроскопия) исходной архитектуры кораллита *Stylophora pistillata* (см. сноску 20) (масштабная полоса = 200 мкм) (b), напечатанный на 3D-принтере промежуточный дизайн скелета (масштабная полоса = 300 мкм) (c) и окончательный бионический каркас, легированный агрегатами с CNC (шкала = 100 мкм) (d). Моделирование методом Монте-Карло на основе трехмерной тетраэдрической сетки (e – g). Свет (675 нм) излучается над соединительной тканью (красная стрелка) как коллимированный²⁵ игольчатый луч. Миграции фотонов с временным разрешением (функция временного рассеяния точки, TPSF [1/мм³]) показано через 0,5 нс (левый столбец), 3 нс (центральный столбец) и 4,5 нс (правый столбец) в виде поперечного сечения двуслойного бионического коралла (e), однослойная бионическая ткань (f) и

²⁴ Рендеринг – термин в компьютерной графике, обозначающий процесс получения изображения по модели с помощью компьютерной программы.

²⁵ Коллимация – создание тонкого параллельно идущего потока излучения с помощью щелей, через которые он проходит.

нерассеивающий GelMA (метакрилат-желатин²⁶) (g). Плотность микроводорослей в твердом компоненте одинакова для всех моделей ($\mu\text{a} = 15 \text{ мм}^{-1}$). Угловое распределение света, рассеянного вперед ($\theta = 270^\circ - 90^\circ$) при длине волны 550 нм, показано как нормализованное пропускание (h). Измерения плотности потока энергии на основе микроронда (E0 в% от падающего излучения) для бионического коралла (i) и плоской пластины из GelMA (j) с плотностью микроводорослей $5,0 \times 10^6$ клеток/мл. Пояснения к рисунку 2: Time - время, Bionic skeleton - бионический скелет, Bionic tissue - бионическая ткань, Normalized intensity - нормализованная интенсивность, Depth - глубина, Wavelength (nm) - длина волны (ни), ns - наносекунда

Созданный бионический коралл увеличивает время пребывания фотонов, когда свет проходит через культуру водорослей (рис. 2e). Увеличение времени пребывания фотона (или длины пути фотона) увеличивает вероятность поглощения света для данной плотности микроводорослей [11]. Когда фотоны проходят через бионический коралл, диффузное рассеяние бионическим скелетом приводит к все более рассеянному световому полю, эффективно увеличивая скалярную освещенность (т.е. интеграл распределения яркости со всех направлений вокруг точки) в зависимости от глубины ткани [4] (рис. 2i, дополнительный рис. 3). Эта стратегия прироста энергии фотонов приводит к неуклонному увеличению скалярной освещенности с глубиной ткани, что уравнивает экспоненциальное ослабление света за счет поглощения фотопигментами²⁷ (рис. 2g) [16]

По сравнению с плоской пластиной из биополимера (GelMA) с той же плотностью микроводорослей ($5,0 \times 10^6$ клеток/мл) скалярная освещенность (для света 600 нм), измеренная в фотосинтетическом слое бионического коралла, более чем в 1,5 раза усиливается на глубине 750 мкм из-за оптимизированных рассеивающих свойств ткани и скелета бионического коралла (рис. 2i, j). Таким образом, бионический коралл имитирует стратегию увеличения длины пути фотонов, которую используют естественные кораллы, чтобы избежать самоуничтожения водорослей [5,10,17].

Оценка характеристик бионического коралла

Чтобы оценить рост свободноживущего штамма микроводорослей с подходящим профилем жирных кислот для производства биоэнергии, авторы выбрали зеленые микроводоросли порядка хлорелловые *Chlorellaceae* (*Marinichlorella kaistiae* KAS603²⁸) 18 (рис. 3a - d). Авторы выращивали *M. kaistiae* KAS603 в условиях отсутствия потока и низкой интенсивности падающего излучения ($E_d = 80$ мкмоль фотонов $\text{м}^2/\text{с}$) в созданном бионическом коралле, где плотность водорослей достигает $> 8 \times 10^8$ клеток/мл в течение 12 дней (рис. 3a). Это примерно на порядок выше максимальной плотности клеток, сообщенной для этого вида водорослей при выращивании в колбах при непрерывном перемешивании [18]. Несмотря на такую

²⁶ Фотополимеризующийся гель на основе желатина.

²⁷ Фотопигменты - лабильные природные органические пигменты, которые подвержены химическим изменениям при воздействии на них света.

²⁸ Коммерческий штамм микроводорослей порядка хлорелловые, разработанный совместно учеными Калифорнийского университета Сан-Диего и Кембриджского университета.

высокую плотность клеток водорослей, излучение не ограничивает рост на глубине, и около 80% падающего излучения остается на глубине 1 мм внутри структуры бионической коралловой ткани (рис. 3б). Для сравнения, стандартные фотобиореакторы (см. сноску 16) на основе биопленки характеризуются экспоненциальным ослаблением света с преобладающим поглощением, приводящим к фактическому истощению освещенности в пределах 200–300 мкм толщины биопленки [19]. Авторы наблюдали, что *M. kaistiae* KAS603 растет в бионической ткани в виде плотных агрегатов (сферичность $0,75 \pm 0,09$ SD²⁹, диаметр = 30–50 мкм, n = 44 агрегата; рис. 4а – d). Фотосинтез водорослей в тканевой конструкции дает чистую фотосинтетическую продукцию O₂ 0,25 нмоль O₂ см²/с на поверхности ткани полипа (рис. 3с). Общий фотосинтез в бионических коралловых полипах 8-ми дней выращивания усиливается на глубине 300 мкм по сравнению со скоростью общего фотосинтеза, измеренной на поверхности бионической коралловой ткани (рис. 3д).

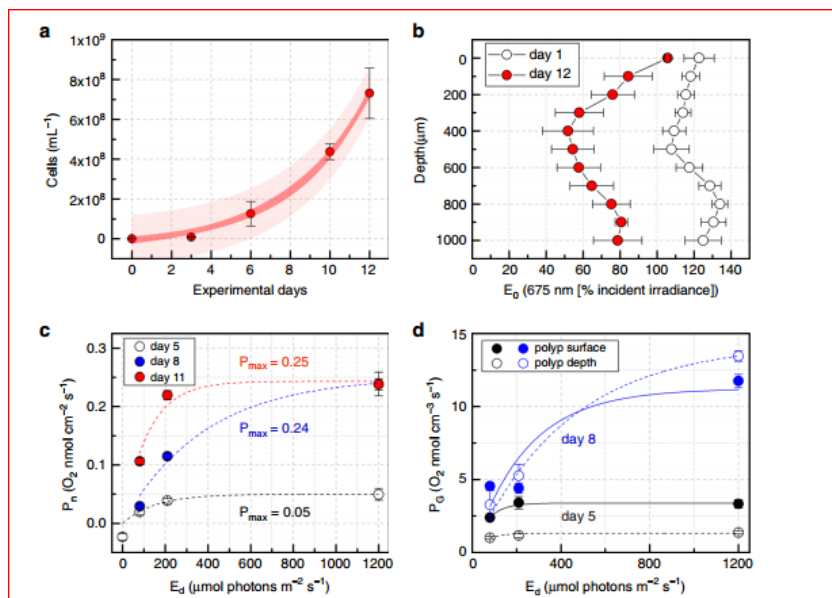


Рис. 3 Тестирование характеристик бионического коралла, напечатанного на 3D-принтере.

Рост *Marinichlorella kaistiae* KAS603 в бионическом коралле (а). Данные представляют собой средние значения (\pm SEM, n = 3-6 бионических коралловых отпечатков). Темные и ярко-красные области показывают 95% доверительный интервал и интервалы прогноза соответственно. Вертикальное ослабление плотности потока энергии (E₀ при 675 нм) в начале (день 1, среднее значение \pm SEM, n = 4) и в конце теста

²⁹ Спектральная область.

производительности (день 12, среднее значение \pm SEM, $n = 3$) (b). Чистая скорость фотосинтеза на 5, 8 и 11 день (среднее значение \pm SEM, $n = 3-10$ кораллитов) (c). Линии представляют собой аппроксимации кривой (см. Методы). Общий уровень фотосинтеза на 5 день (черный) и день 8 (синий) (d). Символы - средние (\pm SEM, $n = 2-6$ кораллитов), линии - аппроксимации кривых. Измерения проводились с помощью микродатчиков O_2 в центре поверхности кораллитовой чашки (закрашенные символы/сплошные линии) и на глубине по вертикали 300 мкм (светлые символы/пунктирные линии).

Пояснения к рисунку 3: Cells/mL⁻¹ – клеток/мл, day- дней, Depth (μ m) – глубина (мкм), E₀ (675 nm [% incident irradiance]) – плотность потока энергии (675 нм [% освещенности падающего излучения]), P_n (O_2 nmol cm⁻²s⁻¹) – фотосинтез водорослей (O_2 нмоль/см²/день), Experimental days – дней экспериментов, P_g (O_2 nmol cm⁻²s⁻¹) – общий фотосинтез (O_2 нмоль/см²/день), E_d (μ mol photons m⁻² s⁻¹) – интегральная освещённость, polyp surface – поверхность полипа, polyp depth – глубина полипа, P_{max} – максимальный фотосинтез.

Приложения для биотехнологии водорослей и исследования кораллов

Новые биочернила авторов продемонстрировали превосходную биосовместимость как со свободно живущими, так и со штаммами донных водорослей (рис. 3а, 4, дополнительный рис. 4). В отличие от других систем на основе биопленок, которые основаны на естественном оседании водорослей [20], используемый здесь быстрый процесс трехмерной биопечати позволяет немедленно инкапсулировать различные штаммы водорослей и поддерживать их рост в индивидуализированной оптической микробиологической среде обитания. В настоящее время невозможно провести прямое сравнение предложенной технологии выращивания водорослей с коммерческими фотобиореакторами, поскольку авторы ограничили печать своих структур до сантиметрового масштаба, а коммерческое применение будет зависеть от инженерных, крупномасштабных, экономически жизнеспособных систем. Однако 3D-биопечать - это технология аддитивного производства, которая быстро развивается в промышленных масштабах [21], и, таким образом, существует большой потенциал для превращения крупномасштабных бионических кораллов в пространственно эффективные фотобиореакторы для выращивания водорослей, например, в густонаселенных городских районах или в качестве систем жизнеобеспечения для космических полетов [16, 22].

Механистические исследования физиологии симбионтов и микробиологической среды обитания-хозяина являются фундаментальными для исследования коралловых рифов, но в настоящее время им мешает разнообразие и сложность природных кораллов. Авторы показали, что можно успешно имитировать различные архитектуры кораллов-хозяев (дополнительный рис. 1), что открывает путь для контролируемых исследований клеточной активности конкретных штаммов *Symbiodinium* (см. сноску 21), имитируя оптическое и механическое микроокружение различных видов кораллов-хозяев. Бионические кораллы также являются важным инструментом для развития симбиоза животных и водорослей и исследований обеспечения кораллов, поскольку предложенный подход 3D-биопечати может быть использован для манипуляционных исследований фотофизиологии³⁰ и стрессо-

³⁰ Физиология процессов фотосинтеза.

вой реакции различных штаммов микроводорослей в условиях *in vivo*, подобных животным-хозяевам. Поэтому авторы ожидают, что бионические кораллы будут стимулировать новые фундаментальные биологические исследования, вдохновят разработку систем синтетических моделей фотосимбиоза³¹ и приведут к революционным технологиям для эффективного увеличения энергии фотонов для биотехнологии водорослей.

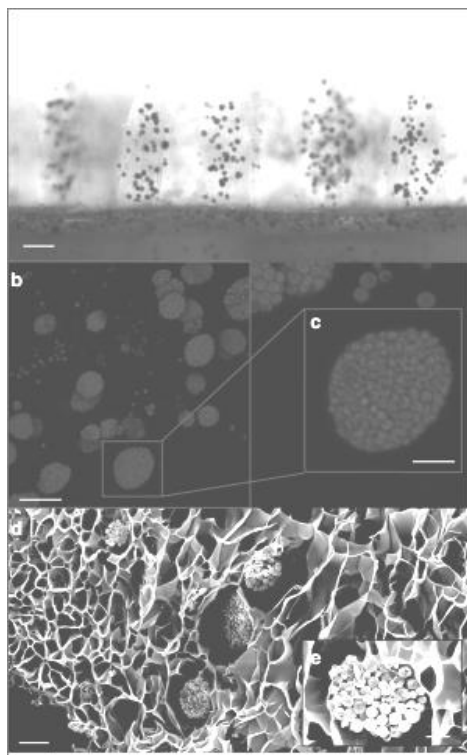


Рис. 4 Живой бионический коралл, напечатанный на 3D-принтере.

Горизонтальный вид 7-дневной конструкции с использованием биопечати, показывающий агрегаты зеленой микроводоросли *Marinichlorella kaistiae* KAS603 (см. сноску 28) (масштабная полоса = 100 мкм) (а). Максимальная z-проекция конфокальных изображений, показывающих флуоресценцию хлорофилла А бионических щупалец (масштабная полоса = 50 мкм) (б) и агрегат (масштабная полоса = 20 мкм) (в). SEV-изображение бионической ткани, показывающее пористые тканевые каркасы (масштабная полоса = 20 мкм) (д) и крупный план агрегата микроводорослей (масштабная полоса = 10 мкм) (е).

³¹ Фотосимбиоз – отношения между двумя организмами, один из которых (например, водоросли) способен к фотосинтезу.

Методы

Оптическая когерентная томография

Для создания цифровой маски естественных коралловых поверхностей использовалась система оптической когерентной томографии (ОКТ) спектральной области (SD) (Ganymede II, Thorlabs GmbH, Дахау, Германия) для изображения живых кораллов (дополнительный рис. 1). Система ОКТ была оснащена суперлюминесцентным диодом³² (с центром на 930 нм) и линзой объектива (эффективное фокусное расстояние = 36 мм) (LSM03; Thorlabs GmbH, Дахау, Германия), обеспечивающими разрешение по оси Z 4,5 мкм и разрешение по оси y 8 мкм в воде. Изображенные виды кораллов (*Pavona cactus* (коралловый кактус), *Stylophora pistillata* (см. сноску 20), *Pocillopora damicornis* (коралл “цветная капуста”, *Favites flexuosa* (каменистый коралл семейства Merulinidae³³) содержались в Центре Scientifique de Monaco³⁴, а изображения кораллов были получены в условиях контролируемого потока и освещенности. Для ОКТ-визуализации голых скелетов кораллов живые ткани удалялись от скелета воздухом. Скелет был тщательно очищен перед визуализацией голого скелета в воде. ОКТ-сканирование проводилось в контролируемых условиях освещения, обеспечиваемых оптоволоконной вольфрамовой галогенной лампой (KL-2500 LCD, Schott GmbH, Германия) с образцами кораллов, помещенными в изготовленную на заказ акриловую проточную камеру, соединенную с резервуаром для воды, обеспечивающим аэрированную морскую воду [15].

Поверхностный рендеринг (см. сноску 24) данных ОКТ

Данные ОКТ были извлечены как несколько 16-ти битных стоковых изображений TIFF (по данной тематике) (формат хранения растровых графических изображений) и импортированы в MATLAB³⁵ (версия 2018a). Нежелательные сигналы полученных изображений были удалены с помощью медианной фильтрации³⁶ трехмерных изображений. Сегментация внешней ткани или поверхности скелета выполнялась с помощью многоуровневой пороговой обработки изображений с применением метода Оцу³⁷ для каждого стокового изображения TIFF. Бинарные файлы экспортировались как облачные точки x , y , z и преобразовывались в формат файла

³² Суперлюминесцентный диод – полупроводниковые светоизлучающие приборы (светодиоды), работающие в режиме суперлюминесценции, т.е. усиления спонтанного излучения за счет вынужденного испускания.

³³ Семейство рифообразующих каменистых кораллов.

³⁴ Научный центр Монако – научно-исследовательское агентство, созданное в 1960 г. Князем Ренье III.

³⁵ Пакет прикладных программ для решения задач технических вычислений, выпущенный в 1984 г.

³⁶ Медианная фильтрация – эффективная процедура обработки сигналов, подверженных воздействию импульсных помех.

³⁷ Метод Оцу – алгоритм вычисления порога бинаризации для полутонового изображения, используемый в области компьютерного распознавания образов и обработки изображений для получения черно-белых изображений.

*stl*³⁸, который можно секционировать на последовательность двумерных изображений для биопечати [23]. Если на файлах *stl* будут появляться отверстия в поверхностной сетке, эти отверстия заполняют вручную с использованием Meshlab³⁹ (версия Meshlab 2016).

Оптимизация модели водоросли – биополимер

Ключевыми характеристиками для достижения материального дизайна были: (1) высокие жизнеспособность и рост клеток микроводорослей; (2) разрешение при печати в микронном масштабе; (3) оптимизация рассеяния света и биомеханических параметров, включая жесткость материала, пористость и молекулярную диффузию. Фото индуцируемый механизм полимеризации свободных радикалов, лежащий в основе предложенного способа трехмерной печати, позволяет точно контролировать механические свойства с помощью оптимизации плотности поперечных связей⁴⁰ полимеризуемых частей [24]. Любой материал и параметры изготовления (например, интенсивность света, время воздействия, концентрация фотоинициатора⁴¹, состав материала), которые воздействуют на плотность поперечных связей, можно использовать для настройки механических свойств печатанных частей. Вначале оценивают различные концентрации преполимера⁴² и сочетаний фотоинициатора, включая глицидил метакрилат – гиаоурановую кислота (GM-NA) (многофункциональный полимерный матрикс для биочернил), GeIMA (биополимер метакрилат-желатин), полиэтиленгликоль диакрилата (PEGDA) (для получения гидрогеля) и полимолочную кислоту, вместе с фотоинициаторами Irgacure 651⁴³ и фенил-2, 4, 6-триметилбензолфосфинат лития (LAP). Авторы комбинировали PEGDA и GeIMA для получения механически прочного и регулируемого гидрогеля. Вначале GeIMA легировали оксидом графена⁴⁴, который повышает механическую стабильность, но ограничивает проникновение света и рост клеток. Авторы разработали систему полимеризации с использованием света с длиной волны 405 нм, чтобы предотвратить вред для водорослей от УФ излучения.

Для оптимизации рассеяния света авторы сначала смешивали гидрогель с различными концентрациями частиц SiO₂ (поставщик Sigma-Aldrich, США), которые находились в диапазоне размеров (около 10 мкм) для инду-

³⁸ Формат файла, широко используемый для хранения трехмерных моделей объектов для применения в аддитивных технологиях.

³⁹ Программная система для обработки трехмерных сеток, которая ориентирована на управление и обработку неструктурированных больших сеток и предоставляет набор для редактирования, очистки проверки, рендеринга и преобразования этих типов сеток.

⁴⁰ Поперечная связь – связь, которая связывает одну полимерную цепь с другой.

⁴¹ Фотоинициатор – молекула, которая при воздействии радиации создает активные частицы (свободные радикалы, катионы или анионы). В фотополимерах ключевыми компонентами являются синтетические фотоинициаторы.

⁴² Преполимер – мономер или система мономеров, которые вступили в реакцию до состояния промежуточной молекулярной массы.

⁴³ Высокоэффективный УФ фотоинициатор бензил диметилкетал. Производит компания Ciba, Швейцария.

⁴⁴ Оксид графена – соединение углерода, водорода и кислорода в различных соотношениях, которое образуется при обработке графита сильными окислителями. Используется для производства сверхпрочной бумаги.

цирования широкополосного рассеяния белого света с высокой эффективностью рассеяния света. Однако при смешении гидрогелей частицы SiO₂ продемонстрировали вертикальный градиент концентрации по отношению к скорости снижения частиц в геле. Вместо этого авторы использовали нанокристаллы целлюлозы (CNCs), у которых проявляются подходящие показатели рассеяния света, механические свойства и низкая массовая плотность [12]. CNCs можно рассматривать как прутьевидные коллоидные частицы (с типичной длиной 150 нм и шириной (диаметром) несколько нм), которые имеют высокий показатель преломления (около 1,55 в видимом диапазоне). CNCs получают возрастающий интерес в фотонике⁴⁵, вследствие их коллоидного поведения и их способности к само ассоциации в холестерические оптические пленки⁴⁶ [25]. В пробах кораллового скелета, полученного с помощью 3D-печати, в которых содержалось 7% вес. CNCs, авторы выявили, что CNCs агрегируются, образуя микрочастицы с размером 1-10 мкм. Эти агрегированные микрочастицы отличаются высокой эффективностью, как отражатели белого света (рис. 2а). Напротив, в бионической коралловой ткани, полученной с помощью трехмерной печати, содержится только 0,1% вес. CNCs.

Полимерный раствор для трехмерной печати (биочернила) для производства бионической коралловой ткани состоит из конечной концентрации: *Marinichlorella kaistiae* KAS603 (1×10⁶ клеток/мл), GeIMA (5% вес.), LAP (0,2% вес.), пищевой краситель (1% вес.), PEGDA (6000 Да; 0,5% вес.), CNC (0,1% вес.) и искусственная морская вода (ASW; 93,2%). Был добавлен пищевой желтый краситель (производитель Wilton® Candy Colors) добавляли для ограничения проникновения индуцированного полимеризацией света в биочернила. Это приводит к более высокому поглощению света по отношению к рассеиванию и увеличению пространственного разрешения печати [24].

Синтез полимера

PEGDA (мол. вес, M_n = 6000) покупали у компании Sigma-Aldrich, США. GeIMA синтезировали путем смешения свиного желатина (Sigma-Aldrich, США) при 10% вес. и ASW (см. выше) и перемешивали при 60°C до полного растворения [25]. Добавляли ангидрид метакриловой кислоты (MA - Sigma-Aldrich, США) до достижения концентрации MA 8% вес. В течение 3 ч при 60°C проходила реакция при постоянном перемешивании. Затем раствор подвергали диализу дистиллированной водой с использованием диализной трубки с отсечкой 12-14 кДа (Spectrum Laboratories, Rancho Dominguez, США) в течение 7 суток при 40°C для удаления любых непрореагировавших групп метакриловой кислоты из раствора. GeIMA подвергали лиофильной сушке⁴⁷ при - 80 ° C в сублимационной сушилке (Freezone,

⁴⁵ Фотоника – дисциплина, занимающаяся фундаментальными и прикладными аспектами работы с оптическими сигналами, а также созданием на их базе устройств различного назначения.

⁴⁶ Холестерические пленки, или холестерические жидкие кристаллы – жидкие кристаллы, обладающие свойством спиральности, т.е. в них отсутствует центральная симметрия.

⁴⁷ Лиофильная сушка или сублимационная сушка – процесс удаления растворителя из замороженных растворов, гелей, суспензий и биологических объектов, основан-

Labonco) в течение одной недели для удаления растворителя²⁵. Суспензии CNC были приготовлены путем гидролиза целлюлозной фильтровальной бумаги Whatman (№ 1) при 64 ° C в течение 30 мин с серной кислотой (64 масс.%) перед гашением ледяной водой (Milli-Q) [12]. Для получения стабильной суспензии CNC (2,2 масс. %) раствор центрифугировали в течение 20 мин при 20000 об/мин и подвергали диализу деионизированной водой (мембрана MWCO 12–14 кДа). Кислотные и растворимые остатки целлюлозы были удалены. Суспензия обрабатывали ультразвуком в ледяной бане (Fisher Ultrasonic) и фильтровали под вакуумом с использованием нитроцеллюлозного фильтра (размер пор 8,0 мкм, затем 0,8 мкм, Sigma-Aldrich). Суспензию CNC упаривали при температуре окружающей среды в течение 24. Фотоинициатор фенил-2,4,6-триметилбензоилфосфинат лития (LAP) был синтезирован в двухстадийном процессе [26]. Сначала 2,4,6-триметилбензоилхлорид (Sigma-Aldrich) медленно добавляли к эквивалентному количеству диметилфенилфосфонита (0,018 моль, Acros Organics) посредством реакции Михаэлиса-Арбузова⁴⁸ при комнатной температуре и в атмосфере аргона. Смесь непрерывно перемешивали в течение 18 ч. Осторожно добавляли бромид лития (6,1 г) в 100 мл 2-бутанона и раствор нагревали до 50 ° C в течение 10 мин. Образовавшийся осадок фильтровали с 2-бутанона под вакуумом [26]. Продукт (LAP) сушили вымораживанием и хранили до дальнейшего использования. Высушенный вымораживанием LAP растворяли в ASW, и CNC диспергировали в растворе LAP путем встряхивания в течение примерно 5 мин.

Непрерывная многослойная 3D биопечать бионических кораллов

Дизайн бионических кораллов был разработан как оптимизация между темпами роста водорослей, оптическими характеристиками и результатами оптических моделей (рис. 2, дополнительные рисунки 2, 3). Окончательный бионический коралл был разработан в программном обеспечении САПР (Autodesk 3ds Max, Autodesk, Inc, США), а затем был разрезан на сотни цифровых рисунков с помощью специально написанной программы MATLAB. Цифровые шаблоны загружали в цифровое микрозеркальное устройство⁴⁹ (DMD) в последовательном порядке и использовали для выборочного экспонирования раствора преполимера для непрерывной печати. Для фотополимеризации использовали панель с видимым светодiodом с длиной волны 405 нм. Цифровое микрозеркальное устройство (DMD), состоящее из 4 млн. микрозеркал, модулировало цифровую маску, проецируемую на раствор преполимера для микромасштабной фотополимеризации [24]. Непрерывное движение DMD было синхронизировано с проецируемой цифровой маской для создания гладких трехмерных конструкций, которые быстро изготавливаются без межфазных артефактов. Для печати

ный на сублимации затвердевшего растворителя без образования макроколичеств жидкой фазы.

⁴⁸ Реакция Михаэлиса-Арбузова – алкилирование триалкилфосфитов алкил галогенидами с образованием диалкил фосфонатов. Используется для синтеза фосфонатов из фосфитов.

⁴⁹ Цифровое микрозеркальное устройство – микрооптоэлектрическая система, устройство с деформируемым зеркалом с использованием микромеханических аналоговых модуляторов света.

бионического коралла был разработан двухэтапный подход к печати. На первом этапе биочернила PEGDA использовались для печати скелета, инициированного кораллами. Полученный гидрогель прикрепляли к поверхности предметного стекла, промывали деионизированной водой и затем сушили с помощью воздушного пистолета. На втором этапе биочернила, содержащие клетки водорослей, для печати на тканях вводились пипеткой в полости скелета, чтобы заполнить воздушные зазоры. Заполненный зазором отпечаток скелета был перемещен в то же место на биопринтере (см. сноску 15), и была загружена маска из ткани бионического коралла. Z-стадия биопечати (послойное изготовление) состоит в том, чтобы поверхность скелетного отпечатка касалась стеклянной поверхности биопринтера.

Поддержание маточной культуры водорослей

Для включения в полимеры с трехмерной биопечатью были выбраны два вида микроводорослей: динофлагелляты⁵⁰, принадлежащие к роду *Symbiodinium* (см. сноску 21), и зеленая водоросль *Marinichlorella kaistiae* (см. сноску 28). Исходные маточные культуры штаммов *Symbiodinium* A08 и A01 (полученные от Mary Coffroth, Университет Буффало) культивировали в среде F/2⁵¹ в цикле свет: темнота 12ч/12 ч при освещенности (400–700 нм) 200 мкмоль фотонов м²/с. Штамм *M. kaistiae* KAS603[18] дикого типа был получен от Kuehnle AgroSystems, Inc. (Гавайи) и культивировался при 25°C в среде с искусственной морской водой (ASW) [27] при непрерывном освещении холодных белых люминесцентных ламп (80 мкмоль фотонов м²/с). Маточные культуры собирали во время фазы экспоненциального роста для использования в биопечати.

Выращивание бионических кораллов

Бионические кораллы, являющиеся местом обитания *Symbiodinium sp.* или *M. kaistiae* KAS603, культивировали в тех же условиях, что и соответствующие маточные культуры водорослей (см. выше). Перед биопечатью биочернила для печати конструкций бионических тканей кораллов инокулировали с плотностью клеток 1×10⁶ клеток/мл из экспоненциально растущих культур. Авторы провели эксперименты по выращиванию 35 бионических кораллов с *M. kaistiae* KAS603. Бионические кораллы переносили в 6-луночные планшеты, заполненные 3мл среды ASW [27], содержащей антибиотика широкого спектра (пенициллин/стрептомицин, Gibco⁵²) в концентрации 1:1000. Все отпечатки были освещены падающим нисходящим излучением (400-700 нм) 80 мкмоль фотонов м²/с, обеспечиваемым светодиодными световыми панелями (AL-H36DS, Ray2, Finnex), излучаю-

⁵⁰ Динофлагелляты, или динофитовые водоросли – крупная группа протистов (группа организмов, не входящая в состав животных, грибов и растений) из надтипа альвеолят. Известно более 2500 современных видов, из которых 90% обитает в морях, остальные – в пресных водах.

⁵¹ Питательная среда – широко распространенная с обогащенной морской водой, предназначенная для выращивания прибрежных морских водорослей, особенно диатомовых.

⁵² Широкий спектр реагентов для работы с клеточными культурами компании Gibco (Thermo Fisher Scientific) (США).

пцим белый свет. Отпечатки выращивали без перемешивания при 25°C. Питательную среду для роста пополяли на 5-й и 10-й день. Деградация ткани на основе GelMA происходила примерно через 10–14 дней, когда численность бактерий поддерживалась на низком уровне с помощью лечения антибиотиками. Такая кинетика разложения может быть полезной для более легкого сбора высококонцентрированных микроводорослей, содержащихся в твердом скелете на основе PEGDA.

Оптические характеристики бионического коралла

Угловое распределение прошедшего света измерялось с помощью оптического гониометра⁵³ [28]. Образцы освещали с помощью ксеноновой лампы (Ocean Optics, HPX-2000), соединенной с оптическим волокном (Thorlabs FC-UV100-2-SR). Угол освещения фиксировался при нормальном падении, а угловое распределение интенсивности регистрировалось поворотом детектора с угловым разрешением 1°. Для обнаружения сигнала использовалось стекловолокно с сердцевиной 600 мкм (Thorlabs FC-UV600-2-SR), подключенное к спектрометру (Avantes HS2048). Для определения характеристик оптических свойств измеряли полный проходящий свет для образцов различной толщины с помощью интегрирующей сферы (спектральные измерители интегральной освещенности [28]). Образцы освещались ксеноновой лампой (Ocean Optics, HPX-2000), соединенной с оптическим волокном (Thorlabs FC-UV100-2-SR), а проходящий свет собирался с помощью интегрирующей сферы (Labsphere Inc.), подключенной к спектрометру (Avantes HS2048). В случае образцов на основе скелетов, когда свет несколько раз рассеивается перед тем, как пройти, перенос света можно описать так называемым диффузионным приближением [29]. В этом режиме аналитическое выражение, которое описывает, как общее пропускание (T) масштабируется с толщиной (L) для геометрии плиты, задается как [30]:

$$T = \frac{1}{l_a} \frac{\sinh\left(\frac{z_e \times l_t}{l_a}\right) \sinh\left(\frac{z_e \times l_t}{l_a}\right)}{\sinh\left(\frac{L + z_e \times l_t}{l_a}\right)} \quad (1)$$

где l_a , l_t и z_e - длина поглощения, транспортная длина свободного пробега и длина экстраполяции, соответственно [29]. Здесь z_e количественно определяет влияние внутренних отражений на границах раздела образца при оценке l_a и l_t [31]. Авторы определили z_e , измерив угловое распределение проходящего света [30], $P(\mu)$, которое связано с z_e следующим уравнением [32]:

$$P(\mu) = \mu \frac{z_e + \mu}{\frac{1}{2}z_e + \frac{1}{3}} \quad (2)$$

где μ - косинус угла пропускания по отношению к падающему баллистическому лучу. Теоретическая подгонка показана на дополнительном рис. 2с, и она привела к значению $z_e = (1,32 \pm 0,12)$. После того, как длина экстрапо-

⁵³Оптический гониометр – оптический прибор для измерения углов.

ляции была оценена, значения I_a и I^t могут быть рассчитаны с помощью уравнения (1) (рис. 2d, e). Это было сделано с помощью итерационной процедуры для проверки стабильности подгонки [31]. В бионической коралловой ткани сила рассеяния материала слишком мала, и диффузионное приближение не может применяться. В этом режиме коэффициент ослабления можно оценить с помощью закона Бера-Ламберта⁵⁴ (рис. 2f).

Показатель преломления (n) ткани бионического коралла с биопечатью был определен с помощью оптического гониометра для определения угла Брюстера⁵⁵ (θ_B). Полукруг из материала был напечатан диаметром 2 см и толщиной $z = 5$ мм. Угол Брюстера рассчитывался по закону Снелла⁵⁶ и Брюстера:

$$n = \frac{\sin(\theta_i)}{\sin(\theta_r)} = \frac{\sin(\theta_i)}{\sin(\theta_{90-i})} = \tan(\theta_i) \quad (3)$$

$$\theta_B = \arctan \frac{n_2}{n_1} \quad (4)$$

где θ_i - угол падения, а θ_r - угол преломления. n_1 и n_2 - показатели преломления исследуемой среды и окружающей среды, соответственно. Для ткани, характерной для кораллов, θ_B находился в диапазоне от $54,0^\circ$ до $55,0^\circ$, давая показатель преломления $n = 1,37-1,40$.

Время полета 3D-моделирования для переноса фотонов методом Монте-Карло⁵⁷.

Тетраэдрические сетки были созданы с помощью триангуляции Делоне⁵⁸ с использованием программы Iso2mesh на основе MATLAB (см. сноску 35), которая называется *cgalmesh*⁵⁹ [33]. Создание сетки выполнялось с различными свойствами сетки, варьируя максимальный объем тетраэдрического элемента и размер сферы Делоне, чтобы оптимизировать эффектив-

⁵⁴ Закон Бера-Ламберта – физический закон, определяющий ослабление параллельного монохроматического пучка света при распространении его в поглощающей среде.

⁵⁵ Закон Брюстера – закон оптики, выражающий связь показателей преломления двух диэлектриков с таким углом падения света, при котором свет, отраженный от границы раздела диэлектриков, будет полностью поляризованным в плоскости, перпендикулярной плоскости падения.

⁵⁶ Закон Снелла (Снеллиуса) описывает преломление света на границе двух прозрачных сред.

⁵⁷ Моделирование распространения фотонов с помощью метода Монте-Карло – гибкий, но точный подход к имитации миграции фотонов. В этом методе локальные правила миграции фотонов представлены как распределения вероятностей, которые описывают размер шага движения фотонов между точками взаимодействия с тканью и углы, на которые отклоняется траектория движения фотона при рассеянии.

⁵⁸ Триангуляция для заданного множества точек S на плоскости, при которой для любого треугольника все точки из S за исключением точек, являющихся его вершинами, лежат вне окружности, описанной вокруг треугольника. Обозначается DT.

⁵⁹ Библиотека алгоритмов вычислительной геометрии.

ность моделирования. Настройки были оптимизированы для сферы Делоне 1 (10 мкм) и объема тетраэдрического элемента 5 (50 мкм). Сгенерированные тетраэдрические сетки использовались в качестве исходной архитектуры для трехмерного моделирования переноса света методом Монте-Карло на основе сетки (*mmclab*) [34]. Модель использует созданную тетраэдрическую сетку и рассчитывает распространение фотонов на основе собственных оптических параметров, коэффициента поглощения μ_a [мм^{-1}], коэффициента рассеяния μ_s [мм^{-1}], анизотропии рассеяния g [безразмерный] и показателя преломления n [безразмерный] [35]. Оптические параметры были извлечены с помощью измерений интегрирующей сферы (см. выше) и использовались для расчета времени пролета фотонов в бионическом коралле. Освещением зонда служил коллимированный точечный источник с переменным расположением источников.

Механические свойства бионической ткани

Модуль Юнга (модуль продольной упругости) бионической коралловой ткани оценивали с помощью измерителя механической прочности в микронной области (*Microsquisher*, *CellScale*). Каждый образец предварительно кондиционировали путем сжатия со скоростью 4 мкм/с для устранения гистерезиса, вызванного внутренним трением. Испытание на сжатие проводилось при деформации 10% и скорости деформации 2 мкм/с. Цилиндрические конструкции были напечатаны на 3D-принтере с использованием тех же биочернил, которые использовались для печати ткани бионических кораллов. Модуль Юнга был рассчитан по линейному участку кривой напряжения-деформации [24]. Были испытаны три образца, каждый из которых подвергся трехкратному сжатию.

Сбор клеток

Плотность клеток определяли в начале эксперимента (день 0), а затем на 3, 6, 10 и 12 день экспериментов по выращиванию. Для определения плотности клеток конструктивный элемент удаляли из ростовой среды, и любой оставшийся раствор, прикрепленный к этому элементу, удаляли с помощью *Kimwipe*⁶⁰. Каждый конструктивный элемент переносили в микроцентрифужную пробирку на 1,5 мл, и гидрогель растворяли путем добавления 600 мкл раствора трипсина (0,25% трипсин/ЭДТА) при инкубации при 37°C в течение 40 мин [23]. Эта процедура использовалась для удаления клеток микроводорослей из матрицы, что позволяло проводить подсчет клеток с помощью гемоцитометра⁶¹. Точность этого подхода была подтверждена путем печати известных значений плотности клеток (из жидкой культуры) и сравнения их с оценками на основе трипсина, что дало отклонение <3%. Однако сама матрица является биосовместимой и нетоксичной, и ее не нужно удалять для сбора биомассы водорослей.

⁶⁰ Безворсовые салфетки для протирания оптических поверхностей.

⁶¹ Микрокомпьютерный калькулятор для подсчета клеток.

Измерения с помощью микродатчика O₂

Микродатчики кислорода типа Clark (размер наконечника = 25 мкм, время отклика <0,2 с; OX-25 FAST, Unisense, Орхус, Дания) использовались для характеристики фотосинтетических характеристик бионических кораллов. Чистый фотосинтез измеряли с помощью линейных профилей O₂, измеренных с помощью микродатчиков O₂ от поверхности до вышележащего диффузного пограничного слоя [2]. Датчики управлялись с помощью моторизованного микроманипулятора (Pyroscience, Германия). Диффузионный поток O₂ был рассчитан с помощью первого закона диффузии Фика⁶² для температуры воды = 25°C и солености = 30 с использованием коэффициента молекулярной диффузии для O₂ = $2,255 \times 10^{-5}$ см²/с [2]. Общий фотосинтез оценивался методом смещения света к темноте [36]. Установка проточной камеры обеспечивала медленный ламинарный поток (скорость потока = 0,5 см/с), а оптоволоконная галогенная лампа (Schott KL2500, Schott, Германия) обеспечивала белый свет при определенных уровнях падающей освещенности (400–700 нм). (0, 110, 220 и 1200 мкмоль фотонов м²/с) [2]. Кривые фотосинтеза-освещенности были аппроксимированы экспоненциальной функцией [37].

Волоконно-оптические микродатчики

Плотность потока энергии (= скалярная освещенность), E₀, внутри бионического коралла была измерена с помощью волоконно-оптических микродатчиков скалярной освещенности с размером наконечника 60–80 мкм и изотропной угловой реакцией на падающий свет ± 5% (Zenzor, Дания). Датчик был подключен к спектрометру (AvaSpecUL2048XL-Evo, Avantes). Измерения плотности потока энергии проводились через ткань с шагом по вертикали 100 мкм с использованием автоматического профилировщика микродатчиков, установленного на сверхмощной стойке и управляемого специальным программным обеспечением (Profix, Pyroscience) [2]. Профили глубины измерялись от плоской поверхности ткани (т.е. областей, удаленных от щупалец) до центра бионического кораллита. Скорость потока энергии нормализовалась к падающей нисходящей освещенности E_d, измеренной с помощью скалярного датчика освещенности, размещенного над черным световым колодцем на таком же расстоянии и размещении в световом поле, что и поверхность конструкций с биопечатью.

Сканирующая электронная микроскопия (SEM).

Изображения SEM были получены с помощью сканирующего электронного микроскопа Zeiss Sigma 500. Образцы готовили двумя разными способами. Для получения изображения скелета бионического коралла, сделанного из PEGDA, образцы сушили при комнатной температуре и покрывали распылением иридия (Emitech K575X Sputter Coater). Для получения изображения бионической ткани коралла, сделанной из GelMA, образ-

⁶² Первый закон Фика описывает квазистационарные процессы, когда проникаемая для обменивающихся местами частиц разделяет две среды с существенно постоянными условиями на границах раздела

цы мгновенно замораживали жидким азотом, а затем лиофилизировали в сублимационной сушилке (Freezone, Laboco) в течение 3 дней. Общая форма не могла быть сохранена, но микромасштабные структуры (такие как микропоры GeMA) были хорошо сохранены. Образцы были покрыты напылением иридия (Emitech K575X Sputter Coater) перед визуализацией на SEM.

Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия⁶³ (CLSM).

Для характеристики размера и распределения агрегатов микроводорослей в 3D печати использовался конфокальный лазерный сканирующий микроскоп (Nikon Eclipse TE-2000U). Бионические кораллы помещали на покрывное стекло и получали изображение снизу лазером с длиной волны 641 нм. Конфокальные стопки флуоресценции хлорофилла *a*⁶⁴ получали с использованием размера точечного отверстия 1,2 мкм, размера вертикального шага для z-стопки = 1 мкм и разрешения по осям x, y 0,6 мкм. Сегментация частиц и визуализация данных были выполнены в ImageJ⁶⁵ и программе конфокальных элементов NIS (Nikon). Сегментация частиц выполнялась с помощью ручного определения порогового значения 229–4095 значений шкалы серого⁶⁶ с коэффициентом очистки 6 × (это устраняет более мелкие частицы, не являющиеся агрегатами), заполнением отверстий и коэффициентом сглаживания 2 ×. Сегментированные частицы анализировали на предмет площади поверхности, объема и плотности частиц на объем.

Библиография

1. Hatcher, B. G. Coral reef primary productivity: a beggar's banquet. *Trends Ecol. Evol.* 3, 106–111 (1988).
2. Roth, M. S. The engine of the reef: photobiology of the coral–algal symbiosis. *Front. Microb.* 5, 422 (2014).
3. Brodersen, K. E., Lichtenberg, M., Ralph, P. J., Kühl, M. & Wangpraseurt, D. Radiative energy budget reveals high photosynthetic efficiency in symbiont bearing corals. *J. R. Soc. Interface* 11, 20130997 (2014).
4. Wangpraseurt, D., Jacques, S. L., Petrie, T. & Kühl, M. Monte Carlo modeling of photon propagation reveals highly scattering coral tissue. *Front. Plant Sci.* 7, 1404 (2016).
5. Enríquez, S., Méndez, E. R., Hoegh-Guldberg, O. & Iglesias-Prieto, R. Key functional role of the optical properties of coral skeletons in coral ecology and evolution. *Proc. R. Soc. B.* 284, 20161667 (2017).
6. Wijffels, R. H. & Barbosa, M. J. An outlook on microalgal biofuels. *Science* 329, 796–799 (2010).

⁶³ Конфокальная микроскопия – разновидность световой оптической микроскопии, обладающая значительным контрастом и пространственным разрешением, что достигается использованием точечной диафрагмы, размещенной в плоскости изображения и ограничивающая поток фонового рассеянного света, излучаемого не из фокальной плоскости объектива.

⁶⁴ Хлорофилл а – особая форма хлорофилла, используемая для окисленного фотосинтеза.

⁶⁵ Программа с открытым исходным кодом для анализа и обработки изображений.

⁶⁶ Полутоновая шкала яркости изображения (серая шкала).

7. Ooms, M. D., Dinh, C. T., Sargent, E. H. & Sinton, D. Photon management for augmented photosynthesis. *Nat. Commun.* 7, 12699 (2016).
8. Sanchez, C., Arribart, H. & Guille, M. M. G. Biomimeticism and bio inspiration as tools for the design of innovative materials and systems. *Nat. Mater.* 4, 277 (2005).
9. Lode, A. et al. Green bioprinting: Fabrication of photosynthetic algae-laden hydrogel scaffolds for biotechnological and medical applications. *Eng. Life Sci.* 15, 177–183 (2015).
10. Marcelino, L. A. et al. Modulation of light-enhancement to symbiotic algae by light scattering in corals and evolutionary trends in bleaching. *PLoS ONE* 8, e61492 (2013).
11. Kühn, M., Cohen, Y., Dalsgaard, T., Jørgensen, B. B. & Revsbech, N. P. Microenvironment and photosynthesis of zooxanthellae in scleractinian corals studied with micro sensors for O₂, pH and light. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 117, 159–172 (1995).
12. Parker, R. M. et al. Hierarchical self-assembly of cellulose nanocrystals in a confined geometry. *ACS Nano* 10, 8443–8449 (2016).
13. Zhu, W. et al. Direct 3D bioprinting of prevascularized tissue constructs with complex microarchitecture. *Biomaterials* 124, 106–115 (2017).
14. Murphy, S. V. & Atala, A. 3D bioprinting of tissues and organs. *Nat. Biotechnol.* 32, 773 (2014).
15. Wangpraseurt, D., Wentzel, C., Jacques, S. L., Wagner, M. & Kühn, M. In vivo imaging of coral tissue and skeleton with optical coherence tomography. *J. R. Soc. Interface* 14, 20161003 (2017).
16. Slade, R. & Bauen, A. Micro-algae cultivation for biofuels: cost, energy balance, environmental impacts and future prospects. *Biomass. Bioenergy* 53, 29–38 (2013).
17. Wangpraseurt, D. et al. In vivo microscale measurements of light and photosynthesis during coral bleaching: evidence for the optical feedback loop? *Front. Microb.* 8, 59 (2017).
18. Sánchez-Alvarez, E. L., González-Ledezma, G., Prats, J. A. B., Stephano Hornedo, J. L. & Hildebrand, M. Evaluating *Marini chlorella kaistiae* KAS603 cell size variation, growth and TAG accumulation resulting from rapid adaptation to highly diverse trophic and salinity cultivation regimes. *Algal Res.* 25, 12–24 (2017).
19. Li, T. et al. Microscale profiling of photosynthesis-related variables in a highly productive biofilm photobioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* 113, 1046–1055 (2016).
20. Berner, F., Heimann, K. & Sheehan, M. Microalgal biofilms for biomass production. *J. Appl. Phycol.* 27, 1793–1804 (2015).
21. Truby, R. L. & Lewis, J. A. Printing soft matter in three dimensions. *Nature* 540, 371 (2016).
22. Hendrickx, L. & Mergeay, M. From the deep sea to the stars: human life support through minimal communities. *Curr. Opin. Microbiol.* 10, 231–237 (2007).
23. Liu, J., Hwang, H. H., Wang, P., Whang, G. & Chen, S. Direct 3D-printing of cell-laden constructs in microfluidic architectures. *Lab. Chip* 16, 1430–1438 (2016).
24. Zhu, W. et al. Rapid continuous 3D printing of customizable peripheral nerve guidance conduits. *Mater. Today* 9, 951–959 (2018).

25. Nichol, J. W. et al. Cell-laden micro engineered gelatin methacrylate hydrogels. *Biomaterials* 31, 5536–5544 (2010).
26. Fairbanks, B. D., Schwartz, M. P., Bowman, C. N. & Anseth, K. S. Photo initiated polymerization of PEG-diacrylate with lithium phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinate: polymerization rate and cytocompatibility. *Biomaterials* 30, 6702–6707 (2009).
27. Darley, W. M. & Volcani, B. Role of silicon in diatom metabolism: a silicon requirement for deoxyribonucleic acid synthesis in the diatom *Cylindrotheca fusiformis* Reimann and Lewin. *Exp. Cell Res.* 58, 334–342 (1969).
28. Vignolini, S., Moyroud, E., Glover, B. J. & Steiner, U. Analysing photonic structures in plants. *J. R. Soc. Interface* 10, 20130394 (2013).
29. Wiersma, D. S. & Lagendijk, A. Light diffusion with gain and random lasers. *Phys. Rev. E* 54, 4256 (1996).
30. Ishimaru, A. *Wave Propagation and Scattering in Random Media* (John Wiley & Sons, 1999).
31. Syurik, J., Jacucci, G., Onelli, O. D., Hölscher, H., Vignolini, S. Bio-inspired highly scattering networks via polymer phase separation. *Adv. Funct. Mater.* 28, 1706901 (2018).
32. Vera, M. & Durian, D. J. Angular distribution of diffusely transmitted light. *Phys. Rev. E* 53, 3215 (1996).
33. Fang, Q., Boas, D. A. Tetrahedral mesh generation from volumetric binary and grayscale images. *Proceeding of IEEE International Symposium on Biomedical Imaging* 53, 1142–1145 (2009).
34. Fang, Q. Mesh-based Monte Carlo method using fast ray-tracing in Plücker coordinates. *Biomed. Opt. Expr.* 1, 165–175 (2010).
35. Jacques, S. L. Optical properties of biological tissues: a review. *Phys. Med. Biol.* 58, R37 (2013).
36. Revsbech, N. P. & Jørgensen, B. B. Photosynthesis of benthic microflora measured with high spatial-resolution by the oxygen microprofile method capabilities and limitations of the method. *Limnol. Oceanogr.* 28, 749–756 (1983).
37. Webb, W. L., Newton, M. & Starr, D. Carbon dioxide exchange of *Alnus rubra*: a mathematical model. *Oecologia* 17, 281–291 (1974).